

STRESZCZENIE

rozprawy doktorskiej pt. "Determinanty patogeniczności wirusa nekrozy pomidora (*Tomato torrado virus*, ToTV)"

mgr Przemysław Wieczorek

Wirus nekrozy pomidora (*Tomato torrado virus*, ToTV; rodzaj *Torradovirus*; rodzina *Secoviridae*) poraża *Solanum lycopersicum* L. wywołując na tym gospodarzu systemiczne nekrozy. W skrajnych przypadkach ToTV doprowadza do śmierci podatnych na infekcję roślin. ToTV infekuje także *Nicotiana benthamiana*, wywołując na tej roślinie chlorozy, mozaiki oraz zniekształcenia blaszek liści. W ramach niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań mających na celu określenie determinant patogeniczności w genomie ToTV indukujących objawy chorobowe na *S. lycopersicum* oraz *N. benthamiana*.

W tym celu przygotowano infekcyjne klony ToTV stanowiące podstawowe narzędzie umożliwiające przeprowadzanie modyfikacji genomu wirusa. Infekcyjne klony ToTV uzyskano dzięki opracowaniu strategii ich wytwarzania opartej na izotermicznej rekombinacji pomiędzy homologicznymi fragmentami kopii RNA (cDNA) wirusa oraz zmodyfikowanego wektora binarnego. W metodzie tej pełnej długości kopie RNA1 i RNA2 wirusa umieszczano pod kontrolą sekwencji promotora 35S wirusa mozaiki kalafiora oraz terminatora syntazy nopaliny w plazmidowym wektorze binarnym. Inokulację roślin przeprowadzono metodą infiltracji stosując zawiesinę *Agrobacterium tumefaciens* transformowanych klonami infekcyjnymi ToTV. Infekcyjne cząstki wirusa zidentyfikowano w liściach systemicznych infiltrowanych roślin.

Wykorzystując infekcyjne klony ToTV wykazano, że zmiana typu fenyloalanina (F₂₁₀) → leucyna (L₂₁₀) w sekwencji kodującej domenę białka 3A wirusa (białko uczestniczące w transporcie) skutkuje utratą zdolności ToTV do porażania *S. lycopersicum*. Jednocześnie taki mutant zachowywał wciąż zdolność do infekowania i indukowania symptomów chorobowych na *N. benthamiana*. Jednocześnie zmiana L₂₁₀→F₂₁₀ odtworzyła zdolność ToTV do porażania pomidora oraz *N. benthamiana*.

Przeprowadzając nadekspresję otwartych ramek odczytu (ang. *open reading frames*, ORF) ToTV w liściach *N. benthamiana* zaobserwowano, że ekspresji N-końcowego fragmentu poliproteiny wirusa (RNA1) towarzyszy reakcja nekrotyczna podobna do odpowiedzi typu nadwrażliwości (HR, ang. *hypersensitive response*). Tak silna reakcja nie jest obserwowana na *N. benthamiana* podczas porażenia ToTV. Na podstawie

przeprowadzonych badań opisano nową domenę funkcjonalną ToTV, którą nazwano 11K. Domena ta stanowi N-końcowy 105-aminokwasowy fragment poliproteiny kodowanej przez RNA1 wirusa. Wprowadzenie sekwencji kodującej 11K do niespokrewnionego z ToTV łagodnego wirusa ziemniaka X (*Potato virus X*, PVX) znacznie wzmacnia jego patogeniczność doprowadzając do wystąpienia nekroz na *N. benthamiana* porażonych PVX-11K. Reakcja nekrotyczna obserwowana na *N. benthamiana* podczas nadekspresji białek wirusa często wiąże się z ich udziałem w hamowaniu procesu potranskrypcyjnego wyciszania ekspresji genów (PTGS, ang. *posttranscriptional gene silencing*). Dalsze badania nie potwierdziły hipotezy, że 11K jest supresorem PTGS.

Infekcji wirusowej towarzyszą zmiany ekspresji genów u gospodarza porażonego patogenem. Zmiany te można oznaczać w sposób ilościowy z zastosowaniem m.in. techniki ilościowego PCR (RT-qPCR, ang. *reverse transcription-quantitative PCR*). Technika ta wymaga przeprowadzenia normalizacji poziomu RNA, do czego wykorzystuje się stabilnie eksprymowane w komórce geny referencyjne. Przeprowadzona analiza poziomu ekspresji dziesięciu genów referencyjnych u *S. lycopersicum* porażonego przez m.in. ToTV wskazała, że geny aktyny (*ACT*), czynnika elongacyjnego 1 α (*EF1 α*) oraz *CAC* (ang. *clathrin adapter complexes medium subunit*) ulegały najmniejszym fluktuacjom podczas infekcji wirusowej.

ToTV powoduje straty w uprawie pomidorów (przede wszystkim w Hiszpanii oraz w Holandii) i z tego względu w latach 2009-2013 wirus ten był umieszczony na liście alertowej EPPO (ang. *European and Mediterranean Plant Protection Organization*). ToTV porażał także rośliny w sposób utajony (również chwasty). Ponadto dostępność powszechnie występującego mączlika szklarniowego – wektora ToTV – narzuca konieczność opracowania metody umożliwiającej wykrywanie tego wirusa w roślinach. W tym celu opracowano test diagnostyczny umożliwiający jednocześnie wykrywanie oraz rozróżnienie ToTV i wirusa mozaiki pepino (PepMV) – dwóch wirusów indukujących systemiczne nekrozy na *S. lycopersicum*.

Poznań, 14 kwietnia 2016

Przemysław Węgralski